



CENTRE REGIONAL AGRHYMET

DEPARTEMENT FORMATION ET RECHERCHE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'INGENIEUR EN PROTECTION DES VEGETAUX

Promotion : 2005 - 2008

Présenté par : João Francisco MONTEIRO

**Contrôle biologique de la pourriture cendrée
(*Macrophomina phaseolina*) du niébé par
l'enrobage des semences avec *Clonostachys
rosea* : Impact des conditions de conservation des semences traitées
sur la performance du bioagent**

Période: Du 2 avril au 12 septembre 2008

Soutenu le 15 Septembre 2008 devant le jury composé de :

Président : Mr SARR Etienne, Expert/Formateur en Nématologie et Virologie

Membres : Dr DIARRA Boua, Expert/Formateur en Phytopharmacie et Appareils et
Techniques de traitement

Membres : Dr HAUGUI Adamou, Nématologiste, INRAN

Maître de Mémoire : Dr Mbaye NDIAYE, Expert/Formateur en Phytopathologie

TABLES DES MATIERES

| | |
|---|-------------|
| DEDICACE | I |
| REMERCIEMENTS | II |
| SIGLES ET ABREVIATIONS..... | III |
| LISTE DES TABLEAUX..... | IV |
| LISTE DES FIGURES | V |
| RESUME | VI |
| ABSTRACT..... | VIII |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| CHAPITRE I. GENERALITES | 3 |
| 1.1 APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE NIEBE (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP.).... | 3 |
| 1.1.1 Importance du niébé | 3 |
| 1.1.2 Caractéristiques agronomiques du niébé | 4 |
| 1.1.3 Production du Niébé | 4 |
| 1.1.4 Contraintes Phytosanitaires du Niébé..... | 5 |
| 1.2 APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE <i>Macrophomina phaseolina</i> | 6 |
| 1.2.1 Bioécologie et épidémiologie | 6 |
| 1.2.2 Méthodes de lutte | 8 |
| 1.3 APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE CHAMPIGNON ANTAGONISTE <i>Clonostachys rosea</i> (<i>Gliocladium roseum</i>) | 11 |
| 1.3.1 Protection des plantes par des traitements biologiques des semences..... | 13 |
| CHAPITRE II. EVALUATION IN VITRO DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE CLONOSTACHYS ROSEA CONTRE <i>Macrophomina phaseolina</i> | 15 |
| 2.1 MATERIEL ET METHODES | 15 |
| 2.1.1 Production d'inoculum | 15 |
| 2.1.2 Revivification de <i>Clonostachys rosea</i> | 15 |
| 2.1.3 Test de dualité..... | 16 |
| 2.1.4 Préparation de la suspension de spores et Traitement des semences..... | 16 |
| 2.1.5 Germination des spores de <i>C. rosea</i> en enrobage sur les graines de niébé..... | 17 |
| 2.2 Test de germination du niébé | 17 |
| 2.3 RESULTATS ET DISCUSSION | 18 |
| 2.3.1 Test de dualité..... | 18 |
| 2.3.2 Effet de la conservation sur la viabilité des spores de <i>C. rosea</i> . | 20 |
| 2.3.3 Test de germination du niébé | 21 |
| CHAPITRE III. EVALUATION EN MILIEU SEMI CONTROLE DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE <i>Clonostachys rosea</i> CONTRE <i>Macrophomina phaseolina</i> | 22 |
| 3.1 MATERIEL ET METHODES | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.1 Matériel végétal..... | 22 |
| 3.1.2 Développement de la pourriture cendrée en serre sur des plants issus de graines enrobés avec <i>C. rosea</i> | 22 |
| 3.3 RESULTATS ET DISCUSSION | 23 |
| 3.3.1 Effet de l'enrobage des graines du niébé par <i>C. rosea</i> sur le développement de la pourriture cendrée en serre à J0 | 23 |
| 3.3.2 Effet de la conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec <i>C. rosea</i> sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre | 25 |
| 3.3.3 Effet de 30 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées par <i>C. rosea</i> sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre..... | 26 |
| 3.3.4 Effet de 60 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec <i>C. rosea</i> sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre..... | 27 |
| CHAPITRE IV. EVALUATION EN PLEIN CHAMP DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE <i>Clonostachys rosea</i> CONTRE <i>Macrophomina phaseolina</i> | 29 |
| 4.1 MATERIEL ET METHODES | 29 |
| 4.1.1 Site d'expérimentation et conditions météorologique | 29 |
| 4.1.2 Echantillonnage de sol | 29 |
| 4.1.3 Analyse chimique du sol..... | 30 |
| 4.1.4 Quantification de l'inoculum initial de <i>M. phaseolina</i> de la parcelle expérimentale..... | 30 |
| 4.1.5 Dispositif | 31 |
| 4.1.6 Conduite de la culture | 31 |
| 4.1.7 Evaluation de la densité de <i>C. rosea</i> dans la rhizosphère des plants | 32 |
| 4.1.8 Estimation de l'inoculum de <i>Macrophomina phaseolina</i> dans les tissus..... | 33 |
| 4.2 RESULTATS ET DISCUSSION | 33 |
| 4.2.1 Quantification de l'inoculum initial du sol de <i>Macrophomina phaseolina</i> | 33 |
| 4.2.2 Développement de la pourriture charbonneuse | 34 |
| 4.2.3 Effet des traitements de semences de niébé avec <i>C. rosea</i> sur la production de niébé..... | 35 |
| CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE..... | 36 |
| CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTION | 38 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 39 |

DEDICACE

Je dédie ce travail :

A mon père Agostinho T. Monteiro qui m'a tout apporté ;

A ma mère Paulina V. Semedo dont les bons conseils et la bonne éducation ne m'a jamais manqués ;

A ma épouse Cesarina M. Correia de son soutien et de sa compréhension ;

Aux mes trois chers enfants que ont supporté la longue période de mon absence, pour qui je trace la voie à suivre.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au Centre Régional AGRHYMET (CRA) dans le laboratoire de phytopathologie du Département de Formation Recherche (DFR) à Niamey.

Je remercie sincèrement mon maître de stage Expert Formateur en Phytopathologie Dr. Mbaye Ndiaye, de sa disponibilité durant tout le long de mon stage, de sa patience et des enseignements qu'il m'a apportés.

Je remercie également Monsieur Etienne Sarr qui m'a tant encouragé dès le début jusqu'à la fin de cette formation.

A Messieurs Dr. Amadou Bocar Bal et Dr. Moussa Dème, pour leur appui et disponibilité.

A tout les professeurs du CRA, des différentes filières, pour des interventions pertinentes et des actions combinées que nous permettent d'assimiler des bonnes connaissances.

Je tiens à remercier tout le personnel du CRA pour leurs aides durant ces trois ans de formations.

Je ne saurai terminer sans remercier vivement le Gouvernement de la République Française, le Comité Permanent Inter-Etat de Lutte contre la Sécheresse au Sahel (CILSS) pour leur soutien financier et appuis techniques.

Enfin, dans l'impossibilité de les nommer tous, que tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leur contribution soient assurés de ma profonde reconnaissance, mes collègues, mes remerciements les plus sincères de m'avoir supportée pendant trois ans.

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide Disoxiribonucleique

CRA : Centre Régional Agrhymet

AGRHYMET : Centre Régional de Formation et D'Application en
Agrométéorologie et Hydrologie Opérationnelle

CaBMV : Cowpea Aphid Borne Mosaic Virus

CGIAR : Groupe Consultatif de la recherche agricole international

CILSS : Comité Permanent Inter-Etat de Lutte contre la Sécheresse au
Sahel

DFR : Département Formation Recherche

DFPV : Département de Formation en Protection des Végétaux

DPV : Direction de la Protection des Végétaux

FAO : Food and Agricultural Organisation (Organisation des Nations Unis
pour l'Agriculture et l'Alimentation

FAOSTAT: Statistical Base of the Food and Agricultural Organisation

IBA: L'acide indole-3-butyrique

IITA: Institut International pour l'Agriculture Tropical

INRAN : Institut National de Recherche Agronomique du Niger

IPV : Ingénieur en Protection des Végétaux

ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricole

JAS : Jour Après Semis

PCR : Réaction de la Polymérase en Chaîne

pH : Potentiel d'hydrogène

PMF : Pourcentage des Plants Morts et Flétris

SBMV : Southern Bean Mosaic Virus

TSPV : Technicien Supérieur en Protection des Végétaux

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Inhibition du développement de <i>M. phaseolina</i> en présence de <i>C. rosea</i> dans les boîtes de pétri | 19 |
| Tableau 2. Effet des traitements de semences avec les isolats de <i>C. rosea</i> sur la levée, le poids et le niveau d'infection des plants..... | 23 |
| Tableau 3. Effet de l'enrobage des semences avec <i>C. rosea</i> sur la levée, le poids des plants et la sévérité des symptômes de pourriture charbonneuse du niébé en serre après 60 jours de conservation | 25 |
| Tableau 4. Teneur en éléments minéraux du sol (Faite l'analyse de variance et porter sur le tableau la moyenne parcellaire) | 30 |
| Tableau 5. Effet des traitements de semences avec <i>Clonostachys rosea</i> sur la fonte de semis, le niveau de colonisation de la rhizosphère et des plants par le bioagent et par <i>Macrophomina phaseolina</i> et l'AUDPC 45 jours après semis..... | 34 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1. Colonie de <i>M. phaseolina</i> sur milieu semi sélectif | 6 |
| Figure 2. Microsclérotés de <i>M. Phaseolina</i> dans les tissus de racine..... | 6 |
| Figure 3. Symptômes de <i>M. phaseolina</i> sur une plantule (A) et sur une plante de niébé en phase reproductive (B) | 8 |
| Figure 4. Colonies, conidiophores et conidies de <i>C. rosea</i> se développant sur un milieu gélosé | 11 |
| Figure 5. Antagonisme de <i>C. rosea</i> envers <i>M. Phaseolina</i> : Mycoparasitisme et compétition pour l'espace | 19 |
| Figure 6. Evolution de la viabilité des spores de <i>C. rosea</i> sur les graines de niébé conservées à 40°C pendant 75 jours..... | 20 |
| Figure 7. Effet des traitements de semences avec <i>C. rosea</i> sur l'évolution de la mortalité des plants en serre. Les semences ont été semées après 30 jours de conservation à 40°C..... | 26 |
| Figure 8. Effet de l'enrobage des semences par <i>C. rosea</i> sur la mortalité (gauche) et le développement (droite) des plants du niébé en serre . | 26 |
| Figure 9. Evolution de la mortalité des plants issus des graines enrobées avec <i>C. rosea</i> et conservées pendant 60 jours à 40°C..... | 27 |
| Figure 10. Effet comparé des durée 30 et 60 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec <i>C. rosea</i> sur la mortalité totale des plants en serre | 28 |
| Figure 11. Température et Humidité relative moyennes enregistrées au cours de l'expérimentation | 29 |
| Figure 12. Densité moyenne de l'inoculum initial de <i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i> dans les sols des essais 1 et 2 | 34 |

RESUME

Dans les sols infestés avec *Macrophomina phaseolina* les semences de niébé ne germent pas ou bien la plantule est détruite plus ou moins rapidement après la germination. *Clonostachys rosea* est un champignon commun du sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition sur les racines et dans le sol. Notre étude a pour objectif d'évaluer l'effet de *C. rosea* en traitement de semences du niébé conservées à 40°C sur le développement de la pourriture charbonneuse. L'effet de la durée de conservation sur la viabilité des spores et le pouvoir antagonique du bioagent a également été étudié dans les conditions semi contrôlé et au champ.

Les isolats de *C. rosea* proviennent de la collection du laboratoire de phytopathologie de AGRHYMET. La production des spores a été effectuée sur le milieu PDA pendant 4 semaines. Les semences du niébé ont été traitées avec une suspension de spores à la concentration de 10^8 spores / ml à raison de 5 ml de suspension par kg de semences. Les semences traitées ont été séchées sous la hotte à flux laminaire pendant 2 h avant d'être semées ou conservées à 40°C. Des tests de viabilité des spores de *C. rosea* sur le milieu de culture PDA ont été effectués au laboratoire tous les 15 jours de conservation.

Le taux de germination des semences sur papier buvard, évalué au cinquième jour après semis au laboratoire a été de 99 %. La forte moyenne de spores viables au jour de l'enrobage (J_0) ($>4,5 \cdot 10^5$), a chuté à 1700 spores par graines après 75 jours de conservation. En serre, le niveau de colonisation des tissus des plants de niébé se développant sur le sol infesté a été significativement plus faible chez les plants issus de graines enrobées (1009 microscélérotés/g tissus) que chez ceux issus de graines non enrobées (2356 microscélérotés/g tissus). Par rapport à la sévérité de la maladie, exprimée sur une échelle de 1-5, ont été notées une forte infection des plants du témoin *Macrophomina* (graines non traitées semées dans un sol infesté) et des attaques moins sévères sur les traitements G3M et G4M (graines traitées semées dans un sol infesté).

Au champ dans l'essai semé avec des graines enrobées mais non conservées, l'association des isolats G3 et G4 a été nettement supérieure aux autres traitements par rapport aux rendements en fane et en graines. Par contre, par rapport au rendement, aucun effet des traitements n'a été observé dans l'essai semé avec les graines conservées pendant 30 jours.

ABSTRACT

Soil infestation or infection of cowpea seeds by *Macrophomina phaseolina* causes poor germination and seedling damping off in field conditions. *Clonostachys rosea* a common fungus in the soil is known as a high competitor saprophyte on plant roots and in soil. Our study aims to evaluate the effect of treatment of cowpea seeds by *C. rosea* on the development of charcoal rot. The effect of storage of coated seeds on the viability and the antagonistic capacity of the bioagent were also studied under semi controlled and field conditions.

The isolates of *C. rosea* kindly provided by the phytopathology laboratory of AGRHYMET. The mass production of the isolates was carried out on PDA medium for 4 weeks. The cowpea seeds were treated with a suspension of 10^8 spores/ml at a rate of 5 ml of suspension per kg of seeds. The treated seeds were dried under the hood with laminar flow for 2 hrs before being sown or being conserved at 40°C. The tests on the viability of *C. rosea* on seeds was carried out on PDA medium culture every 15 days storage.

On blotter paper, the seed germination rated 5 d after sowing was 99 %. The number of viable spores ($> 4,5 \cdot 10^5$) recorded at the first day of seed treatment dropped to 1700 spores per seed after 75 days storage. In glasshouse, in infested by *M. phaseolina* soil, seedlings from coated seeds were significantly less infected (1009 microsclerotia/g tissues) than seedling raised from coated seeds (2356 microsclerotia/g tissues). The disease severity, expressed on a 1-5 scale indicated a high infection of plant growing in the *Macrophomina* control pots (untreated seeds sown on infested soil). From coated seeds with the isolates G3 and G4 of *C. rosea* and planted in infested by *Macrophomina* soil grew plants with low disease index.

At field condition, in the trial sown with coated and not stored seeds, the association of the isolates G3 and G4 were the best treatment with respect to the hay, pod, and grain yield. In contrast, there was non significant difference between treatments, in the trial sown with coated and stored seed during 30 days.

INTRODUCTION GENERALE

Le développement économique des pays sahéliens passe nécessairement par celui de l'agriculture et de l'élevage qui constitue les deux principales activités de cette région de l'Afrique. Cependant, les aléas climatiques (pluviométrie mal répartie dans le temps et dans l'espace), les problèmes édaphiques (sol sableux, pauvre en matière organique), les contraintes inhérentes aux pratiques culturales (faible taux d'amendement organique et minérale), l'accroissement rapide de la population, les pressions parasitaires constantes, la faible fertilité des sols fait que la majorité des sahéliens vivent dans une économie de subsistance.

Dans la plupart des pays sahéliens sont pratiquées les cultures pluviales et irriguées. Cependant, le mil, le sorgho, le maïs, le niébé, le haricot et l'arachide sont régulièrement cultivés en conditions pluviales.

Le niébé se cultive dans sa grande majorité en association avec les céréales (mil, sorgho ou maïs). Cette association céréales – légumineuse permet de mieux occuper le champ mais aussi de lutter contre certains nuisibles notamment les mauvaises herbes. En outre la faible densité de l'hôte rend sa détection difficile par les ravageurs, aussi la légumineuse enrichit le sol en azote.

Le niébé est cible d'une multitude d'attaques des ennemis de différentes sortes : insectes, agents de maladies, adventices dont la conséquence est la diminution de rendement. Parmi les nombreuses maladies du niébé nous, nous intéressons particulièrement à la pourriture charbonneuse causée par *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanitch.

Ce champignon tellurique cause la pourriture charbonneuse sur plusieurs espèces cultivées et peut provoquer des pertes de production 80 - 100 % (Ndiaye, 2007 ; Adam, 1986) si aucune mesure de lutte n'est prise pour réduire l'inoculum primaire dans le sol. Présentement, aucune méthode de

lutte efficace utilisable par le paysan sahélien n'est disponible. La protection des semences avec un agent de la lutte biologique pourrait constituer une solution durable. Elle nécessiterait cependant une étude des conditions idéales de conservations des semences traitées. En effet le traitement des semences est une technologie qui a connu un progrès limité lié aux difficultés de formulation, à l'instabilité du stockage, à la vie des produits en magasin après leur application sur la semence et de l'irrégularité de leur efficacité biologique.

Notre étude s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif d'évaluer la performance de *C. rosea* en traitement de semences de niébé conservées à 40°C à réduire la pourriture charbonneuse du niébé causé par *Macrophomina phaseolina* et à accroître les rendements.

CHAPITRE I. GENERALITES

1.1 Aperçu bibliographique sur le Niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

1.1.1 Importance du niébé

Le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), une espèce de la famille des *Fabaceae* est d'origine tropicale. Il comporte plusieurs sous-espèces qui sont actuellement cultivées dans toutes les zones tropicales, dans le bassin méditerranéen et aux Etats Unis

Cultivé traditionnellement dans plusieurs pays en association avec les céréales, le niébé était, jusqu'à une époque récente, réservé à l'autoconsommation familiale. Une partie croissante de la production est maintenant destinée à la vente sur les marchés urbains, et à l'exportation vers d'autres pays. Le marché export, rémunérateur et demandeur, représente un débouché potentiel important. Le niébé présente donc l'avantage d'être à la fois :

- Une culture de rente potentielle, source de revenus pour les familles, particulièrement intéressante dans des régions ne produisant pas de coton ou d'autres cultures commerciales.
- Une culture vivrière, riche en protéine, susceptible de contribuer à la sécurité alimentaire des populations et à l'équilibre de l'alimentation à base de céréales.

En effet, le niébé est un aliment de base apprécié en Afrique car ses feuilles, ses gousses vertes et ses graines sèches peuvent être consommées et commercialisées. La graine mûre contient 23-25 % de protéine, 50-67 % d'amidon, des vitamines B tel que l'acide folique qui est important dans la prévention de malformation chez le nouveau-né. La graine est également riche en micro-éléments essentiels, tels que le fer, le calcium et le zinc (Cisse et Hall, 2002). La graine moulue est utilisée pour

la préparation de plusieurs plats traditionnels Africains, dont la bouillie, le pain, l'aliment de sevrage pour enfants ou encore transformée en beignets. Certaines variétés à cycle court, mûrissent tôt, ce qui permet de disposer d'un aliment de bonne qualité pendant les périodes de soudure (août et septembre).

1.1.2 Caractéristiques agronomiques du niébé

Du point de vue agronomique, selon Cisse et Hall (2002), le niébé est bien adapté aux conditions climatiques, édaphiques, technologiques et socioéconomiques de l'Afrique Subsaharienne. Son intérêt particulier en Afrique réside dans :

- une adaptation à la sécheresse du fait de variétés à cycles très courts;
- un haut potentiel de fixation biologique de l'azote dans les aires de cultures traditionnelles dont les sols sont pauvres (faible teneur en matière organique ($<0,2\%$), haute composante de sable ($>85\%$),
- une adaptation à une gamme large de pH (4,5 – 9,0) ;
- une tolérance aux hautes températures durant son stade végétatif ;
- un bon comportement sous l'ombrage ;
- une croissance végétative rapide ;
- de multiples usages comme légume vert (feuille et gousses), graines sèches et fourrage.

L'adaptation à la sécheresse du niébé est un caractère essentiel pour les zones sèches des savanes de l'Afrique occidentale et orientale.

1.1.3 Production du Niébé

La production mondiale du niébé est estimée à 3,4 millions de tonnes (FAO, 2004) de graines sèches dont 64% sont réalisés en Afrique.

La superficie cultivée annuellement dans le monde est estimée à plus de 12,5 millions d'ha dont environ 9,8 millions d'ha sont réalisés en Afrique

de l'Ouest, faisant de cette région la première productrice et consommatrice de niébé dans le monde (FAO, 2004).

Les principaux pays producteurs en Afrique de l'Ouest sont le Nigéria, le Niger, le Mali, le Burkina Faso, le Sénégal et le Ghana. Une production non négligeable est aussi obtenue dans certains pays de l'Afrique de l'Est comme l'Ouganda, le Mozambique, la Tanzanie et l'Ethiopie (IITA, 1983).

Le rendement moyen mondial du niébé est relativement faible et se situe à moins de 300 kg à l'hectare. En Afrique, les rendements moyens varient de 50 à 550 kg/ha en fonction des variétés utilisées, du degré d'utilisation d'intrants (engrais et pesticides), du système de culture (associée ou pure) et des conditions agro-climatiques (Cisse et Hall, 2002).

1.1.4 Contraintes Phytosanitaires du Niébé

La culture du niébé est exposée à plusieurs problèmes phytosanitaires, dont les insectes nuisibles, les nématodes, les maladies virales, bactériennes et fongiques. Certains pathogènes fongiques causent la fonte de semis (Ndiaye 2007). Les semences infectées ne germent pas ou bien la plantule est détruite plus ou moins rapidement après la germination par :

- *Macrophomina phaseolina*;
- *Corticium rolfsii* (Sacc.) Curzi (= *Sclerotium rolfsii* Sacc.);
- *Rhizoctonia solani* Kühn;
- *Pythium* spp.

1.2 Aperçu bibliographique sur le *Macrophomina phaseolina*

1.2.1 Bioécologique et épidémiologie

La pourriture charbonneuse constitue la maladie la plus destructive rapportée sur le niébé. *M. phaseolina* peut causer des dégâts considérables sur le niébé quand les sols deviennent chauds et secs. Ce pathogène provoque également des dégâts importants sur d'autres cultures comme : le sorgho (*Sorghum vulgare*), l'arachide (*Arachis hypogea*), le gombo (*Hibiscus esculentus*), le sésame (*Sesamum indicum*), et l'oseille (*Hibiscus sabdariffa*) (Ndiaye, 2007).

M. phaseolina est caractérisé par un mycélium très ramifié, d'abord hyalin puis noirs charbon ou gris cendre avec l'âge (Fig.1). Très rapidement, ce mycélium forme des microsclérotés noirs (Fig.2) de 50 à 90µm de diamètre (Adam, 1995). Les pycnides sont noirs et globuleuses de 100 à 200µm avec des ostioles par lesquels sont libérés les conidies que sont hyalines, de forme ovale ou elliptique http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Macrophomina/macrophominia_phaseolinia.HTM. C'est un champignon plus représenté dans les pays chauds, dont la croissance est très rapide entre 25 et 35°C, inhibée en dessous de 10°C ou au-delà de 40°C (Adam, 1995).

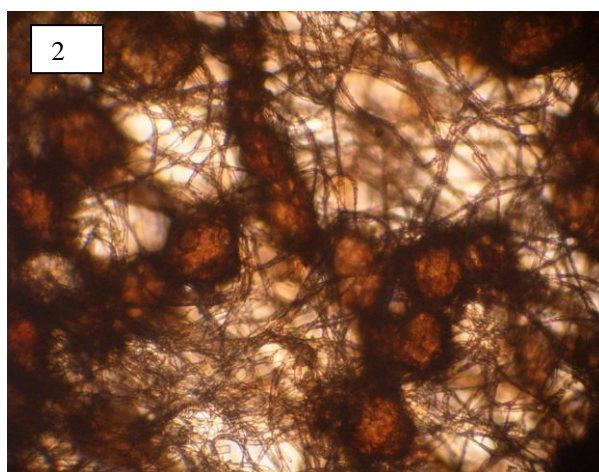
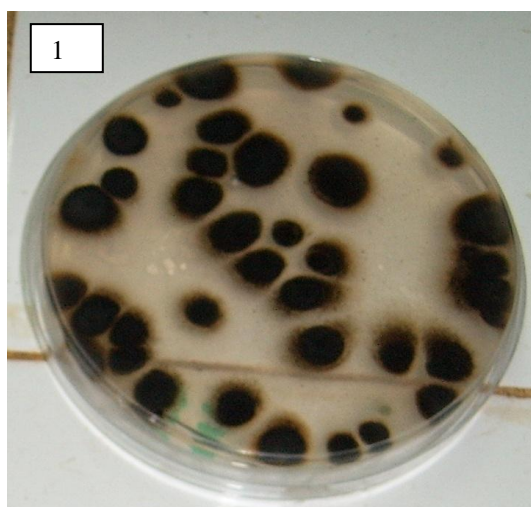


Figure 1. Colonie de *M. phaseolina* sur milieu semi sélectif

Figure 2. Microsclérotés de *M. Phaseolina* dans les tissus de racine

Les sclérotés produits dans les tissus végétaux sont libérés dans le sol au fur et à mesure que les résidus de récolte se décomposent. Ces sclérotés ainsi que ceux associés aux résidus de l'hôte peuvent rester viables pendant 2 – 15 années selon les conditions environnementales (Cook et al. 1973 ; Short et al. 1980).

Selon Dhingra & Sinclair (1975), la survie des microsclérotés dans le sol est variable et beaucoup de facteurs semblent influencer la persistance des propagules de *M. phaseolina* dont le niveau de l'humidité dans le sol.

La conservation et la propagation de l'inoculum sont assurées exclusivement par des sclérotés et des pycnides dotées d'une très grande résistance aux conditions écologiques rigoureuses (Cottingham, 1981).

Les microsclérotés dans le sol ou dans les tissus de l'hôte (semences) constituent l'inoculum primaire. Ils germent à la surface de la racine et produisent de nombreux tubes germinatifs. La pénétration se produit généralement dans les cellules épidermiques par les appressoria formés ou par les ouvertures naturelles. Les hyphes fongiques se développent d'abord de manière intercellulaire et puis intracellulaire dans le xylème et forment des microsclérotés qui bouchent les vaisseaux (Short et al. 1978). Les sclérotés complètement formés sont métaboliquement des propagules en quiescence, qui ne vivent donc plus aux dépens de l'hôte (Smith, 1969). Ainsi, *M. phaseolina* a deux phases écologiquement distinctes – une phase mycélienne ou parasite, et une phase de sclérote ou non parasitaire.

M. phaseolina provoque les symptômes de la pourriture cendrée par l'obstruction des vaisseaux du xylème par les microsclérotés mais également par la production de toxine et action enzymatique (Mihail, 1989). Les symptômes de *M. phaseolina* selon Ndiaye (2005), (fig. 3) sont des pourritures sèches, charbonneuses ou cendrées des graines ; fonte de semis (mort de la plantule par suite des lésions provoquées au niveau du

collet, des racines) ; flétrissement de la plante suite à la pourriture des racines et des radicelles et/ou obstruction des vaisseaux surtout en conditions sèches.



Figure 3. Symptômes de *M. phaseolina* sur une plantule (A) et sur une plante de niébé en phase reproductive (B)

Les flétrissements sont des symptômes observés généralement au début de la fructification. Les plantes attaquées ne produisent pas, ou produisent moins avec des graines infectées constituant ainsi l'inoculum primaire de la maladie. Un des symptômes caractéristiques est l'assèchement du sommet des feuilles sans perte de la couleur verte. Les stress hydriques et nutritionnels que subissent les cultures au cours de leur végétation sont des facteurs aggravants de la maladie (Diourte et al., 2007).

1.2.2 Méthodes de lutte

En face d'un champignon polyphage qui se conserve et se dissémine par les semences et le sol, il est difficile de mettre au point des méthodes de lutte efficaces. Par conséquent, l'utilisation de cultivars de niébé résistants ou tolérants constitue les mesures de contrôle les plus appropriées contre un tel pathogène. Mais de tels cultivars ne sont pas encore disponibles contre *M. phaseolina*.

L'utilisation des fongicides systémiques et/ou de contact semble avoir un effet satisfaisant en condition expérimental. Cependant, le traitement des semences s'avère inefficace contre *M. phaseolina* en cas de forte infestation du sol (Jana et al., 2005).

Le développement de *M. phaseolina* peut aussi être réduit

significativement dans les parcelles infestées et les rendements de niébé corrigées par l'utilisation de rotation appropriés et par des amendements organiques. En effet la culture du fonio sur des parcelles fortement infestées a permis de réduire la densité de l'inoculum du sol de 81% dès la première année et de 100% après trois années de monoculture (Ndiaye et al., 2008).

L'apport localement dans les trous de semis (méthode Zaï ou Tassa) de 6 tonnes de compost ha⁻¹ seul ou combiné avec 50 kg de NPK ha⁻¹ a entraîné une réduction de 79 % de la sévérité de la maladie et de tripler les rendements en niébé. Un meilleur contrôle a été obtenu avec l'application de 3 tonnes ha⁻¹ de compost dont le potentiel antagonique a été renforcé par l'addition de l'agent biologique *C. rosea* (Ndiaye, 2007).

Egalement, la solarisation de parcelles amendées avec des matières organiques riches en azote tels que les contenus de panse (3 tonnes ha⁻¹) des animaux abattus a permis une réduction de 66% de l'inoculum initial du sol et de doubler les rendements en niébé (Ndiaye et al., 2007).

La lutte Microbiologique est très prometteuse dans le cas des maladies d'origine tellurique qui sont difficilement contrôlés avec les pesticides de synthèse ou les variétés résistantes (Alabouvette et al., 1993). Les avantages offerts par les procédés biologiques résident surtout dans l'absence presque totale de risques toxicologiques. A cet égard, des formulations techniques ont été mises au point pour favoriser l'utilisation des agents de lutte biologique, tels que :

- ✓ *Trichoderma harzianum* <http://www.pmra-arla.gc.ca/francais/pdf/reg/reg2002-01-f.pdf> ;
- ✓ *Fusarium oxysporum* non pathogène (Eparvier, 2003) ;
- ✓ *Gliocladium spp.* (Alabouvette et al., 1993);
- ✓ *Penicillium sp* (Wakelin et al., 2007) ;
- ✓ *Pythium oligandrum* (Karine, 2002).

Les microorganismes, contrôlent les pathogènes par différents mécanismes notamment le mycoparasitisme, la compétition pour les substrats et la compétition pour les sites d'infection. En outre, il a été également signalé comme bénéfique à la croissance des plantes l'apport d'organismes microbiens dans le sol (<http://www.pmra-arla.gc.ca/français/pdf/reg/reg2002-01-f.pdf>).

Le compost appliqué au sol renouvelle ses réserves en humus et en fertilisants nécessaires au bon développement des plantes, et stimule l'activité biologique du sol contribuant ainsi à une protection contre les maladies d'origine tellurique (Israël et al., 2005).

Dans le cas spécifique de *M. phaseolina*, plusieurs auteurs ont rapporté des cas d'antagonismes in vitro de plusieurs microorganismes. Les stratégies de contrôle de la pourriture cendrée devraient inclure l'utilisation d'agents biologiques pour prévenir l'infection des hôtes ou empêcher le développement de l'agent causal. Des antagonistes tels que *Aspergillus spp.* ; *Trichoderma spp.* ; *Streptomyces spp.* ; *Clonostachys spp.*, sont utilisés dans ce cadre. Par exemple un contrôle efficace de la pourriture charbonneuse des racines causée par *M. phaseolina* a été obtenu sur arachide à différents niveaux d'humidité par des traitements des semences avec *Trichoderma* (Adam, 1986). Selon Ndiaye (2007), il existe dans les sols sahéliens, des isolats de l'agent de lutte biologique *C. rosea* très compétitifs pour l'espace par rapport à *M. phaseolina*.

1.3 Aperçu bibliographique sur le champignon antagoniste *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*)

C. rosea est un champignon commun du sol reconnu comme un saprophyte avec une haute capacité de compétition sur les racines des plantes en décomposition. On le rencontre régulièrement sur une extraordinaire gamme d'habitats, variant de la région subarctique, région tempérée, région tropicale et région désertique. *C. rosea* a été signalé fréquemment sur les racines des plantes, sur les animaux et insectes morts, sur les nématodes et sur de nombreux champignons, (Schroers et al., 1999).

La colonie de *C. rosea* (fig. 4) a une croissance rapide et est veloutée à duveteuse, blanche au départ puis devenant rose à saumon puis vert foncé lorsque les conidies se forment. Les conidiophores sont ramifiés en forme de pinceaux. Les conidies sont unicellulaires, blanches à vert foncé et à paroi lisse. Elles restent agglutinées en fausses têtes. Ce champignon produit des substances volatiles toxiques telles la gliovirine et la gliotoxine (Schroers et al., 1999).

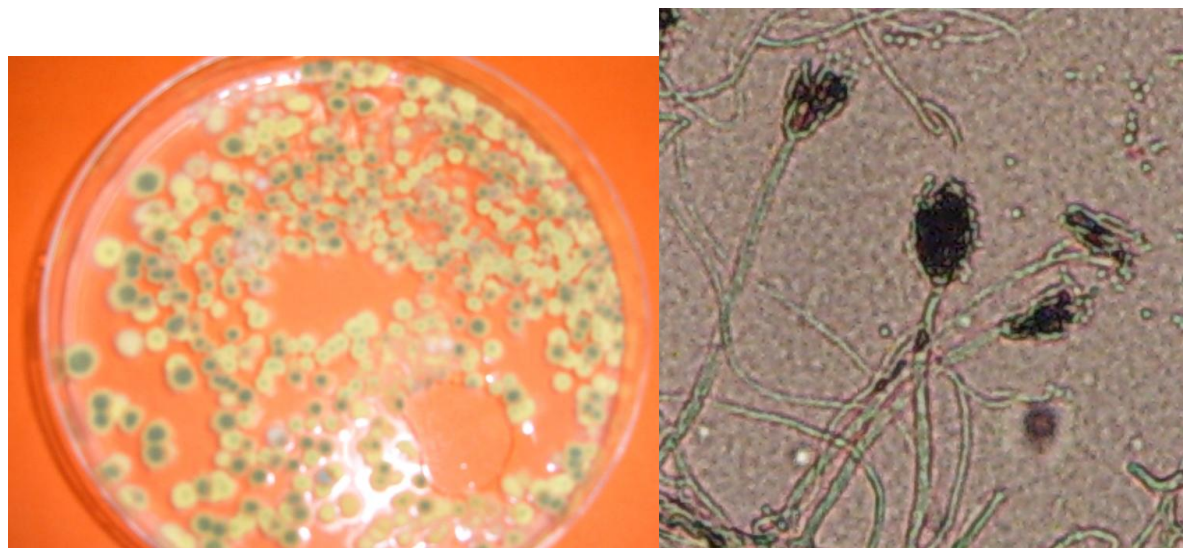


Figure 4. Colonies, conidiophores et conidies de *C. rosea* se développant sur un milieu gélosé

Grâce à sa haute aptitude saprophytique, ce champignon est actuellement utilisé comme un agent de la lutte biologique. Sutton et al. (1997) ont

signalé que *C. rosea* est fréquemment associé aux kystes des nématodes et aux sclérotés des champignons de l'espèce *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis spp.*, *Verticillium spp.*, et d'autres champignons du sol et matériel végétal tel que racines, fruits, semences et autres.

Des tests réalisés au laboratoire en France ont permis de sélectionner une souche de *Gliocladium roseum* capable de contrôler le développement des maladies du bois de la vigne causée par *Eutypa lata* et *Phaeomoniella chlamydospora*. Parmi d'autres micro-organismes testés en protection des plaies de taille seule la souche de *Gliocladium roseum* semble intéressante pour pouvoir contrôler le développement d'*Eutypa lata* et de *Phaeomoniella chlamydospora* www.itvfrance.com/vigne_terroir/maladies_bois.php. 2005.

Des travaux de recherche effectués par Ndiaye (2007) ont montré que le traitement du compost avec *C. rosea* peut protéger efficacement la culture du niébé en réduisant significativement le taux d'infection de *M. phaseolina*.

Par ailleurs, James & William (2007) ont breveté le 27 Septembre 2007 au Canada la souche *C. rosea* 88-710, apte à inciter la vigueur, la santé, la croissance et le rendement des végétaux. En effet, sous forme d'inoculant, le champignon peut agir en symbiose avec les bactéries *rhizobium* pour stimuler et produire un effet additionnel sur le développement de nodules fixateurs d'azote des légumineuses et sur l'augmentation de la croissance des fèves, du soja, des pois et de l'alfalfa notamment. La souche *C. rosea* 88-710 peut également être combinée avec des hormones d'enracinement, l'acide indole-3-butyrique (IBA) par exemple, pour obtenir un produit inoculant ayant des effets bénéfiques d'enracinement sur les boutures et les plants repiqués. En plus de ses propriétés antagoniques, *C. rosea* 1k726 a montré un effet stimulateur de la croissance des plants de tomate grâce principalement à une solubilisation

plus accrue du phosphore (Ravnskov et al., 2006).

D'autres avantages de *C. rosea* sont qu'il est facile à produire et facile à utiliser dû à sa grande capacité de coller sur les substrats traités. C'est ainsi que la production en masse de la souche endophyte *C. rosea* 88-710 peut être obtenue par un système de fermentation sur de la gélose de pomme de terre et dextrose (PDA) ou de la gélose à l'extrait de Malt (James and William, 2007). Selon Sutton (1994), *C. rosea* est efficace aussi bien à basse (10 – 15°C) qu'à haute température (20 – 25°C) en supprimant *Botrytis cinerea* sur les fruits de 85% à 100%.

1.3.1 Protection des plantes par des traitements biologique des semences

Les agents de contrôle biologique utilisés en traitements de semences sont des micro-organismes qui protègent les semences et les semis contre divers pathogènes. La recherche d'alternatives aux pesticides de synthèses et l'intérêt croissant pour les méthodes de production biologique ont stimulé le développement scientifique des agents de contrôle biologique au cours des dernières années.

La souche ACM941 de *C. rosea* utilisé en traitement de semence, colonise la rhizosphère et les racines et permet une augmentation du développement de la plante. En outre, il réduit significativement l'infection de la plantule par un complexe de champignons tels *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium f. sp. pisi*, *F. solani f. sp. pisi*, *Pytium spp.*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotinia sclerotiorum*, qui causent la fonte de semis sur le pois (*Pisum sativum*) (Xue, 2002). Chez le pois la germination in vitro a augmenté de 44% et la levée de 22% et la sévérité de l'infection réduite de 76% grâce au traitement de semence avec ACM941. Une autre formulation utilisant ACM941, a augmenté la levée de 17,1 % et réduit la gravité du pourridié de 29,6 % Xue (2003). Des résultats très satisfaisants de *C. rosea* contre l'agent causal de la

pourriture grise des fruits *Botrytis cinerea* en traitement des fruits en conservation ont été signalés au Brésil (Sutton et al., 1997).

CHAPITRE II. EVALUATION IN VITRO DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE *CLONOSTACHYS ROSEA* CONTRE *MACROPHOMINA PHASEOLINA*

2.1 Matériel et Méthodes

2.1.1 Production d'inoculum

Macrophomina phaseolina a été obtenu par isolement à partir de graine de niébé infectée. Pour garantir la quantité suffisante d'inoculum requis pour les différents tests, le champignon a été multiplié en masse par repiquage d'un explant de 5 mm de diamètre sur un milieu de culture PDA simple, fraîchement préparé. Les boîtes de pétri ainsiensemencées ont été incubées pendant 4 semaines à 28°C.

2.1.2 Revivification de *Clonostachys rosea*

Les isolats de *C. rosea* proviennent de la collection du laboratoire de phytopathologie de AGRHYMET. Ils sont au nombre de 8 et sont dénommés G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 et G8.

Revivification c'est un procédé qui consiste à activer les champignons qui étaient conservés à 4°C en les repiquant sur les milieu de culture fraîchement préparés. Pour l'obtention d'une culture jeune, un milieu simple est préparé avec du Potato Dextrose Agar (PDA).

Trente neuf grammes de Potato Dextrose Agar (PDA) prêt à l'emploi ont été pesés et mis dans un erlenmeyer de 1 l contenant de l'eau distillée. La solution a été homogénéisée à l'aide d'un barreau magnétique. L'erlenmeyer a été chauffé au bain marie pour dissoudre les grains d'agar. Puis nous avons ajusté la solution à 1 l avec de l'eau distillé. Le milieu de culture ainsi obtenu a été réparti dans des bouteilles de 200 ml qui ont été ensuite placées dans l'autoclave à vapeur pour la stérilisation à 121°C pendant 30 mn. Les bouteilles ont été laissées se refroidir dans le bain marie à 55°C.

Dans des condition stériles, sous la hotte à flux laminaire à coté d'un bec Benzène, le milieu été coulé dans les boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, un explant de 5 mm a été prélevé des cultures de champignons destinés à la revivification et a été déposé au milieu des boîtes de pétri contenant le milieu de culture fraîchement préparé. Les boîtes ont ensuite été scellées avec du parafilm pour éviter toute contamination, et incubées à une température de 30°C pendant 4 semaines.

2.1.3 Test de dualité

Il s'agit de vérifier in vitro, si les bioagents peuvent individuellement inhiber la croissance du pathogène et si leur association peuvent augmenter davantage cette inhibition.

Huit isolats de *C. rosea* ont été testés. Des explants de 5 mm de diamètre de *C. rosea* et de *M. phaseolina* ont été découpés avec une emporte pièce, et placés côte à côte (à 1 mm de distance) à l'aide d'une aiguille montée, au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu gélosé fraîchement préparé. Les boîtes ainsiensemencées ont été incubées à 30°C pendant une semaine et les diamètres des champignons mesurés à l'aide d'une règle graduée toutes les 24 h pendant 4 jours. Trois boîtes de pétri ont été utilisées pour chaque combinaison des microorganismes. En plus de ces combinaisons, chaque bioagent a été testé seul.

La formule suivante a été utilisée pour calculer le taux d'inhibition ($TI_{M.ph}$ (%)) de *M. phaseolina* par *G. roseum*):

$$TI_{M.ph} = (DB - XM \times 100) / DB$$

DB= Diamètre de la colonie de *M. Phaseolina* en l'absence de l'antagoniste ;

XM= diamètre moyen de la croissance de *M. phaseolina* en présence des souches de *G. roseum*.

2.1.4 Préparation de la suspension de spores et Traitement des semences

Les cultures de *C. rosea* âgées de 4 semaines ont été lavées avec 5 ml d'eau distillée stérile. A l'aide de 2 barreaux magnétiques, un placé à

l'intérieur de la boîte et l'autre à l'extérieur, les spores ont été détachés de la surface du substrat gélosé. Le lavât a été récupéré, à l'aide d'une micropipette pasteur et placé dans un tube à essai. Une petite quantité de cette solution a été diluée jusqu'à 10^{-6} pour la quantification des spores à l'aide d'un hémacytomètre et l'ajustement de la suspension de traitement à 10^8 spores/ml.

Les semences du niébé de la variété mouride ont été traitées avec une suspension de spores des isolats à raison de 5 ml de suspension par kg de semences. La suspension ajustée à 10^8 spores/ml a été déposée sur les graines contenues dans un erlenmeyer de 500 ml et celui-ci a été agité vigoureusement pour une bonne répartition des spores sur toutes les graines. Les semences ainsi traitées ont été séchées sous la hotte à flux laminaire pendant 2 h avant d'être semées ou conservées à 40°C.

2.1.5 Germination des spores de *C. rosea* en enrobage sur les graines de niébé

Tous les 15 jours de conservation, jusqu'à 120 jours, des tests de germination des spores de *C. rosea* sur le milieu de culture PDA ont été effectués au laboratoire. La méthode a consisté à placer 15 graines de chaque traitement dans 3 tubes à essai contenant chacun 2 ml d'eau distillée stérile. Les tubes ont été agités pendant 15-20 min pour décoller les spores de *C. rosea* adhérant à la surface des graines. La solution obtenue a été diluée au 1/10 jusqu'à la concentration 10^{-6} . Ensuite 100 μ l de chaque concentration ont été étalés en 3 répétitions sur un milieu gélosé semi sélectif (Ndiaye et al., 2007). Les boîtes ensemencées ont été finalement incubées à la température de 30°C pendant 72 h et les colonies formées dénombrées.

2.2 Test de germination du niébé

Tous les 30 jours après conservation le pouvoir germinatif des graines de niébé traitées a été éprouvé par la méthode du papier buvard.

Cette méthode a consisté à stériliser 3 boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre, dont les fonds ont été tapis de papier buvard imbibé d'eau

distillée. Les boîtes refroidies à la température ambiante ont ensuite étéensemencées avec 10 graines de niébé chacune. Les graines ont été disposées de façon équidistante pour empêcher le contact entre elles et donc une éventuelle contamination. Chaque traitement a été testé dans 3 boîtes de pétri.

Après germination au bout de 5 jours, les plantules normales et anormales ont été inventoriées. Les plantules normales sont les plantules vigoureuses, dont la radicule, la partie aérienne et le géotropisme ne présentent aucune anomalie (Rao et al., 2006).

Analyses statistiques

Pour les tests effectués au laboratoire et dans la serre le dispositif utilisé c'est la randomisation totale, alors que en plein champ on a utilisé le dispositif bloc complet randomisé.

Toutes les variables étudiées ont été analysées avec le logiciel Genstat 10^{ème} Editions. La séparation des moyennes a été effectuée par le test de Student-Newman-Keuls.

2.3 Résultats et Discussion

2.3.1 Test de dualité

L'analyse de variance a fait ressortir des différences significatives au seuil $\alpha = 5 \%$ entre les différents isolats de *C. rosea* testées (Tableau 1). Tous les isolats étaient capables de réduire *in vitro* le développement de *M. phaseolina*. Les isolats G3 et G4 ont provoqué le taux d'inhibition le plus élevé (70 et 55 %) et G8 le plus faible (39 %).

Tableau 1. Inhibition du développement de *M. phaseolina* en présence de *C. rosea* dans les boîtes de pétri

| Isolat de <i>C. rosea</i> | Diamètre de <i>M. phaseolina</i> (cm) | Diamètre de <i>C. rosea</i> (cm) | Taux d'inhibition (%) |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| G1 | 3,9 | 4,0 | 44,2 ^{bc} |
| G2 | 3,5 | 5,3 | 49,3 ^{bc} |
| G3 | 2,2 | 5,4 | 70,0 ^a |
| G4 | 3,0 | 5,6 | 55,5 ^{ac} |
| G5 | 3,8 | 6,1 | 44,9 ^{bc} |
| G6 | 2,9 | 5,3 | 58,7 ^{ac} |
| G7 | 3,2 | 3,3 | 53,2 ^{bc} |
| G8 | 4,1 | 4,8 | 39,3 ^b |
| M | 8,5 | 8,5 | |
| Prob. $\alpha = 5\%$ | | | <.001 |
| CV (%) | | | 18.2 |

Pour une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre indiquent une différence non significative au seuil $\alpha = 5\%$.

Prob= Probabilité

CV (%)= Coefficient de variation

M = *Macrophomina phaseolina*.

Les isolats G3 et G4 ont été retenus pour la suite des expérimentations parce qu'en plus, des niveaux d'inhibition importants vérifiés, ils se développaient sur la colonie du pathogène indiquant en plus un potentiel de contrôle par le mycoparasitisme (Fig.5).

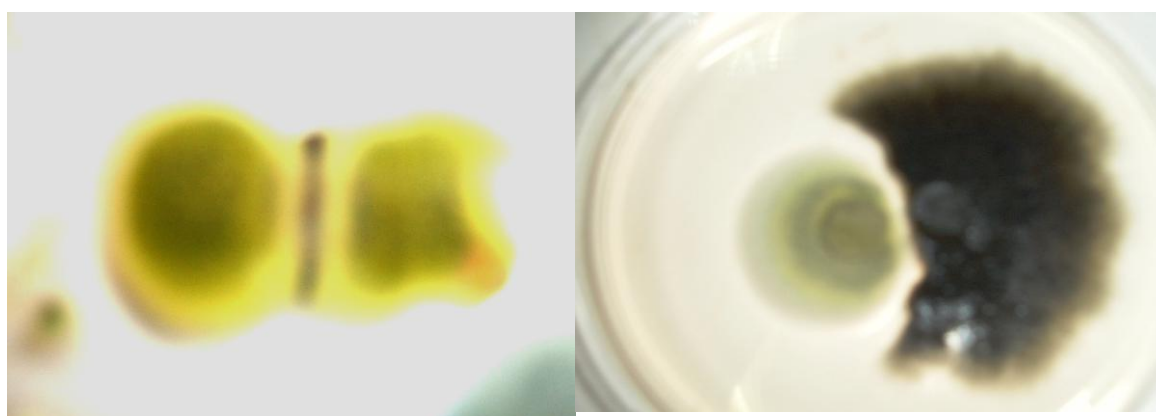


Figure 5. Antagonisme de *C. rosea* envers *M. Phaseolina* : Mycoparasitisme et compétition pour l'espace

2.3.2 Effet de la conservation sur la viabilité des spores de *C. rosea*

Les tests de viabilité des spores de *C. rosea* réalisés tous les 15 jours, pendant 75 jours ont indiqué que la durée de conservation à la température de 40°C, a un effet sur la viabilité des spores (Fig. 6). L'analyse des semences après l'enrobage, avant la conservation (J0), a montré un fort taux de spores viables par graine ($4,5 \cdot 10^5$). Cette viabilité a baissé jusqu'à $2,5 \cdot 10^5$ spores par graine après 30 jours de conservation (J30). Au J60 le nombre de spores viables par graine a été faible ($2 \cdot 10^4$), pour presque disparaître sur les graines au 75^{ème} jour après conservation (J75). Le nombre de spores par graines obtenu à J0 et J30 peut être considéré comme suffisante pour assurer une protection efficace des graines du niébé, comme l'indiquent les résultats de notre expérimentation.

Par rapport à l'aptitude à la conservation à 40°C, l'analyse de variance au seuil $\alpha = 5 \%$ n'a pas fait ressortir une différence significative entre les isolats, par contre la durée de conservation a affecté significativement la viabilité des isolats du bioagent (Fig. 6).

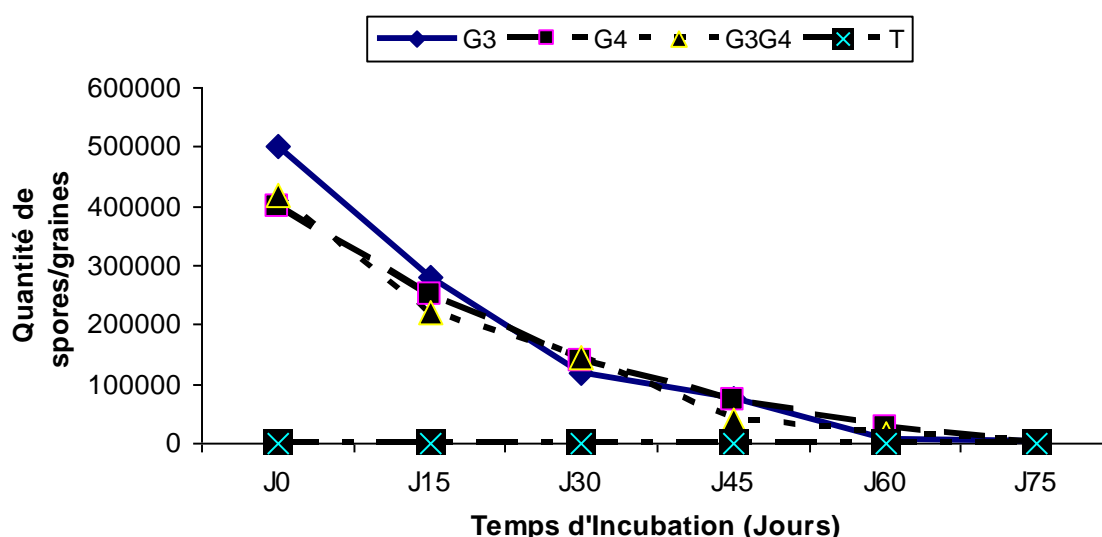


Figure 6. Evolution de la viabilité des spores de *C. rosea* sur les graines de niébé conservées à 40°C pendant 75 jours.

Le pouvoir germinatif des spores conservées à 40°C a baissé significativement dans le temps (Fig. 6). La forte moyenne de spores viables au jour de l'enrobage (J0) ($>4,5 \cdot 10^5$), a chuté à 1700 spores par

graines après 75 jours de conservation.

2.3.3 Test de germination du niébé

Le taux de germination des semences sur papier buvard, évalué au cinquième jour après semis au laboratoire a été de 99 %.

Au champ, la levée a été de 88,75%. Avec ce taux de germination, nos graines sont considérées comme de très bonnes qualités. En effet, selon Rao et al., (2006) pour les légumineuses les semences ayant le taux de germination supérieur à 85 % sur papier buvard et plus de 70 % sur sol champêtre sont d'excellente qualité.

CHAPITRE III. EVALUATION EN MILIEU SEMI CONTROLE DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE *CLONOSTACHYS ROSEA* CONTRE *MACROPHOMINA PHASEOLINA*

3.1 Matériel et Méthodes

3.1.1 Matériel végétal

Les semences de niébé de la variété Mouride utilisées ont été produites pendant la contre saison 2008. Sélectionné au CNRA de Bambey, au Sénégal, cette variété est caractérisée par un port semi érigé, une croissance déterminée, une résistance au virus CAbMV, au chancre bactérien et au striga. Par contre elle est considérée sensible au puceron, au thrips, au bruches et à la pourriture cendrée (Cissé et al., 1995).

3.1.2 Développement de la pourriture cendrée en serre sur des plants issus de graines enrobés avec *C. rosea*

Un mélange de sable et de compost (3 :1 v/v) a été stérilisé pendant 4 h à 210°C. Après refroidissement et aération pendant 24h, le mélange a été infesté avec l'inoculum de *M. phaseolina* sur milieu gélosé à raison de 5 % (pds/pds). Cet inoculum a été constitué d'une culture âgée de 28 jours sur milieu gélosé PDA du pathogène. Le sol infesté a été utilisé pour remplir des pots de 500 ml, préalablement lavés et désinfestés par trempage pendant 30 mn dans une solution de NaOCl à 3%. Les pots ont été ensuite placés en serre dans un dispositif plan complètement aléatoire et arrosés pendant 3 jours. Ils ont été finalement semés avec les graines enrobées ou non avec *C. rosea* et conservées à 40°C, en raison d'une graine par pot. Des semis ont été faits les jours 0, 30 et 60 après conservation. Les traitements pour le semis J0 ont été au nombre de 18 (les huit isolats avec leur témoin, le témoin *Macrophomina* et le témoin non traité - sol non infesté et graines non enrobées). Les semis J30 et J60, comportaient cinq traitements : sol infesté semés avec des graines enrobées avec les isolats G3 ou G4 de *C. rosea* ou leur combinaison ou avec des graines non

enrobées (témoins).

Des échantillons d'enveloppes séminales, de cotylédons, de hypocotyles et de racines sont prélevés 7, 25 et 45 jours après semis pour évaluer la population de *C. rosea* dans la rhizosphère. La levée a été notée 7 j après semis et le nombre de plants morts relevés toutes semaines. Au 45^{ème} jour après semis, les plants ont été dépotés, et analysé pour l'indice de sévérité, le poids de la biomasse totale et racinaire et le niveau de colonisation des tissus par *M. phaseolina*.

3.3 Résultats et Discussion

3.3.1 Effet de l'enrobage des graines du niébé par *C. rosea* sur le développement de la pourriture cendrée en serre à J0

Le poids des plants (1,13 g) issus de semences non enrobées et semées dans un sol infesté s'est révélé le plus faible. Les plants issus des semences enrobées avec le bioagent et semées dans un sol non infesté par *M. phaseolina* possédait un poids moyen nettement plus élevé (3,1 g) que celui des plants issus de graines enrobées se développant sur sol infesté (1,57 g) (tableau 2), mais égal à celui du témoin absolu (graine non enrobées dans du sol non infesté) (3,48 g).

Tableau 2. Effet des traitements de semences avec les isolats de *C. rosea* sur la levée, le poids et le niveau d'infection des plants

| Traitements | Levée (%) | Poids des plants | Niveau d'infection ¹ |
|-------------|------------------|--------------------|---------------------------------|
| G1 | 100 ^a | 3,45 ^b | 1 ^a |
| G1M | 83 ^a | 1,08 ^{ab} | 4 ^c |
| G2 | 100 ^a | 3,62 ^b | 1 ^a |
| G2M | 100 ^a | 1,62 ^{ab} | 4 ^c |
| G3 | 100 ^a | 3,32 ^b | 1 ^a |
| G3M | 100 ^a | 1,53 ^{ab} | 3,33 ^c |

| | | | |
|----------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| G4 | 100 ^a | 3,15 ^{ab} | 1 ^a |
| G4M | 100 ^a | 1,72 ^{ab} | 4 ^c |
| G5 | 100 ^a | 3,55 ^b | 1 ^a |
| G5M | 100 ^a | 1,32 ^{ab} | 4 ^c |
| G6 | 100 ^a | 2,67 ^{ab} | 1 ^a |
| G6M | 100 ^a | 1,97 ^{ab} | 3 ^{abc} |
| G7 | 100 ^a | 2,95 ^{ab} | 1 ^a |
| G7M | 100 ^a | 2,72 ^{ab} | 2,5 ^{abc} |
| G8 | 100 ^a | 2,35 ^{ab} | 1,67 ^{ab} |
| G8M | 100 ^a | 0,6 ^a | 4,17 ^c |
| M | 100 ^a | 1,13 ^{ab} | 4,17 ^c |
| Ta | 100 ^a | 3,48 ^b | 1 ^a |
| Prob. $\alpha = 5\%$ | 0.467 | <.001 | <.001 |
| CV (%) | 9.7 | 21.2 | 17.4 |

Pour une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre indiquent une différence non significative au seuil $\alpha = 5\%$.

Ta=Témoin absolu : Sans *C. rosea* et sans *M. phaseolina*

M = *Macrophomina phaseolina*;

Prob= Probabilité ;

CV (%)= Coefficient de variation ;

1 Note sur une échelle de sévérité de 1-5.

La forte infestation du sol par *M. phaseolina* (423 microscélrote/g de sol) n'a pas affecté la levée des plants dans les pots en serre, due probablement par les bonnes conditions de levée. Cependant, le niveau de colonisation des tissus des plants se développant sur le sol infesté a été significativement au seuil $\alpha=5\%$ plus faible chez les plants issus de graines enrobées (1009 microscélrotes/g tissus) que ceux issus de graines non enrobées (2356 microscélrotes/g tissus). Le niveau d'infection a aussi été différent entre les plants des différents traitements, indiquant que les isolats de *C. rosea* testés possédaient des potentiels différents de protection contre la pourriture cendrée.

3.3.2 Effet de la conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec *C. rosea* sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre

En moyenne, nonobstant la durée de conservation, les traitements n'ont pas affecté la levée qui était très bonne (96 %). Par contre, en ce qui concerne le poids des plants, il est ressorti une différence significative entre les différents isolats (G3, G4 et G3G4) et le témoin *Macrophomina*. Le poids moyen des plants issus des graines traités avec les isolats du bioagent était de 3,76 g contre 7,62 g pour les plants du témoin absolu (sol sains et graines non traitées) (Tableau 3). Cependant, ce traitement n'était pas significativement différent du traitement G3 (Tableau 3).

L'analyse de variance pour la sévérité de la maladie, exprimée sur une échelle de 1-5 a ressorti une différence hautement significative entre les traitements (Tableau 3). Les plants du traitement G3G4 ont été aussi sévèrement attaqués que les plants du témoin *Macrophomina* (graines non traitées semées dans un sol infesté), mais moins attaqués que les traitements G3M et G4M.

Tableau 3. Effet de l'enrobage des semences avec *C. rosea* sur la levée, le poids des plants et la sévérité des symptômes de pourriture charbonneuse du niébé en serre après 60 jours de conservation

| Traitements | Levée (%) | Poids plants | Niveau d'infection |
|-------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| G3M | 100 ^a | 5,25 ^{bc} | 3,00 ^b |
| G3G4M | 100 ^a | 2,09 ^{ab} | 4,25 ^c |
| G4M | 100 ^a | 3,94 ^{ab} | 3,12 ^b |
| TM | 87,5 ^a | 0,35 ^a | 4,75 ^c |
| T- | 100 ^a | 7,62 ^c | 1,00 ^a |
| Prob. α= 5% | 0.427 | <.001 | <.001 |
| CV (%) | 16.2 | 26.8 | 31.7 |

Pour une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre indiquent une différence non significative au seuil α = 5%.

3.3.3 Effet de 30 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées par *C. rosea* sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre

Par rapport à l'évolution de la pourriture charbonneuse, 10 % des plants du premier essai étaient morts, dès la première observation soit 22 % de la mortalité totale (Fig.7). Les plants du traitement témoin (sol infesté, graines non traitées) ont été les plus affectés, avec 100 % de mortalité au bout de la troisième semaine de culture (Fig.8).

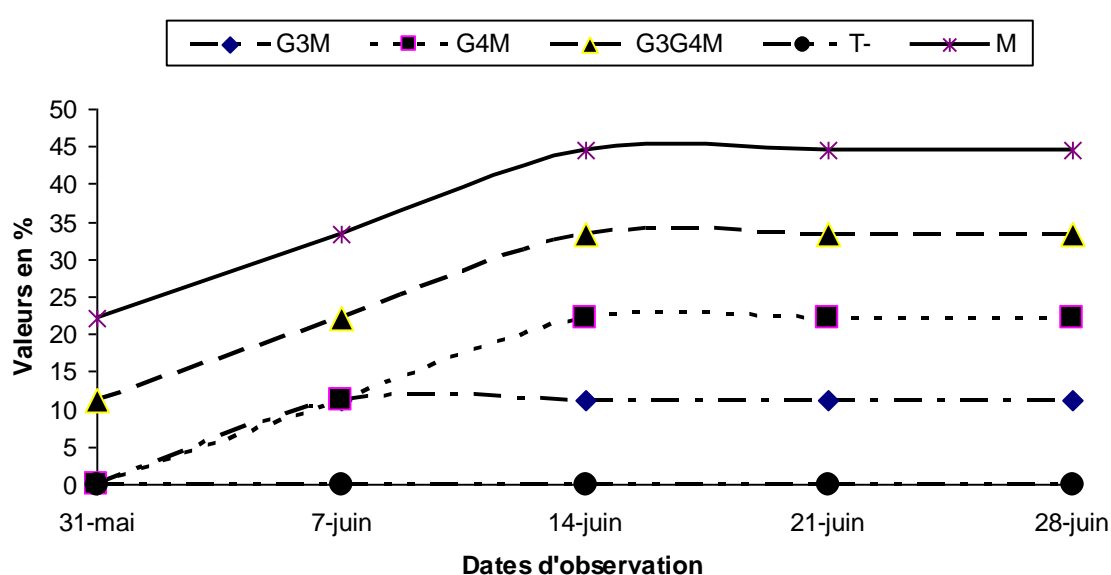


Figure 7. Effet des traitements de semences avec *C. rosea* sur l'évolution de la mortalité des plants en serre. Les semences ont été semées après 30 jours de conservation à 40°C. Le cadre des symboles de la légende en noir

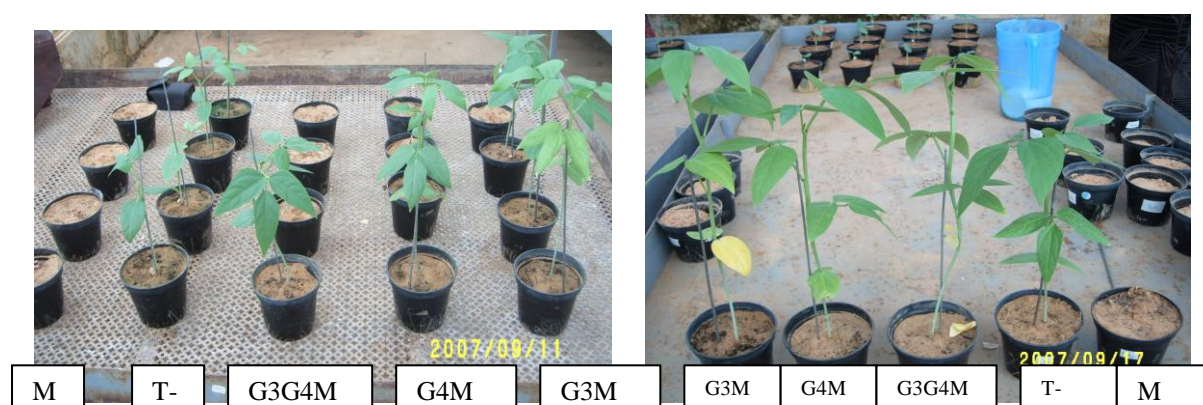


Figure 8. Effet de l'enrobage des semences par *C. rosea* sur la mortalité (gauche) et le développement (droite) des plants du niébé en serre

3.3.4 Effet de 60 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec *C. rosea* sur le développement de la pourriture charbonneuse en serre

Au niveau du 2^{ème} essai, installé le 26 juin 2008 après 60 jours de conservation des graines, aucune mortalité n'a été observée au cours des trois premières observations (Fig. 9). Mais à la 4^{ème} observation, ont été observés 15 % de mortalité des plants, ce qui représente 60 % de la mortalité totale.

Sur l'ensemble des essais, aucune mortalité n'a été observée sur les traitements T-, (Fig. 10), ce qu'indique l'absence d'autres causes des mortalités. Un bon niveau de protection des plants (75 % de plants vivants) a été obtenu avec les isolats G3 et G4, alors que l'association de ces deux isolats n'a permis qu'une protection de l'ordre de 37,5 %. Au niveau du témoin M (sol infesté et graines non protégées), le taux de survie des plants a été de 25 %.

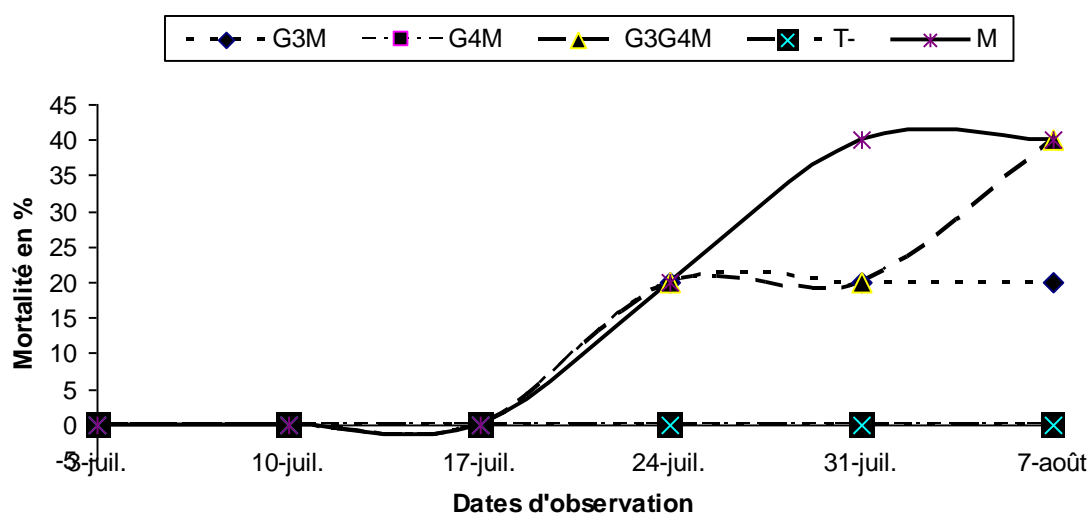


Figure 9. Evolution de la mortalité des plants issus des graines enrobées avec *C. rosea* et conservées pendant 60 jours à 40°C

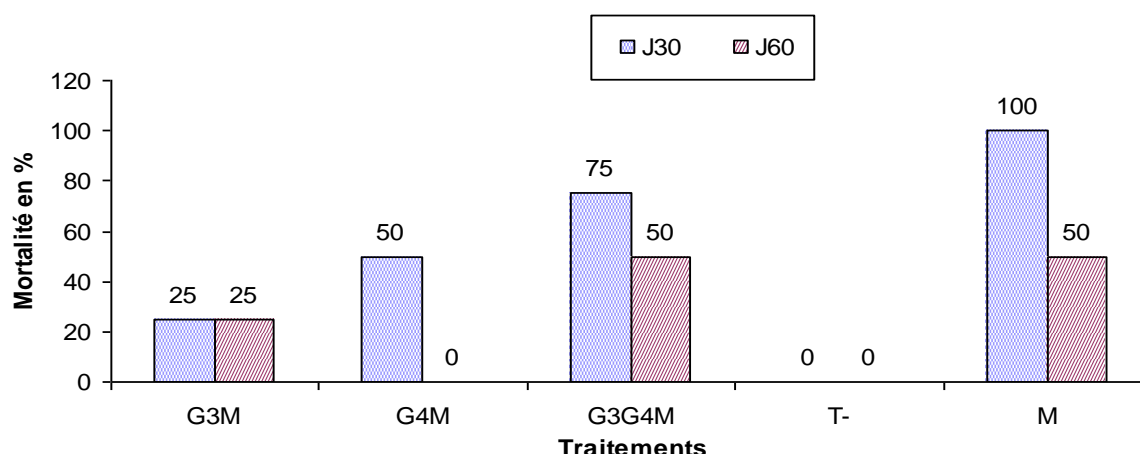


Figure 10. Effet comparé des durées 30 et 60 jours de conservation à 40°C des graines de niébé enrobées avec *C. rosea* sur la mortalité totale des plants en serre

Le traitement M (sol infesté, semé avec des graines non traitées) a eu un taux de mortalité maximale de 50 %, semblable au traitement G3G4M (sol infesté semé avec des graines traitées avec l'association des isolats G3 et G4). Aucun plant mort n'a été enregistré au niveau du témoin sol non infesté (T-) et G4M (sol infesté, semé avec des graines traitée avec l'isolat G4).

L'analyse du sol des pots infesté, a indiqué un taux d'infestation de 423 microsclérotes par gramme du sol, ce que nous considérons très élevé. En effet, selon Ndiaye et *al.* (2008) un taux d'infestation de 53 microsclérotes par grammes de sol est capable de causer 100 % de mortalité des plantes en condition naturelle d'infestation du sol. Ce qui indique un bon potentiel de contrôle de la pourriture charbonneuse par nos isolats

CHAPITRE IV. EVALUATION EN PLEIN CHAMP DU POTENTIEL ANTAGONIQUE D'ISOLATS DE *CLONOSTACHYS ROSEA* CONTRE *MACROPHOMINA PHASEOLINA*

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 Site d'expérimentation et conditions météorologiques

La parcelle expérimentale a été installée au niveau du périmètre irrigué du CRA. Les coordonnées géographiques relevées étaient : 13° 29' 985" N et 02° 06' 151" E. 520 mm de pluies ont été enregistrés pendant cette période répartis sur 32 jours. Les températures moyennes ont varié entre 33 et 25 °C juillet et août étant les mois les moins chauds avec des humidités relatives de l'ordre de 70 % (Fig. 11).

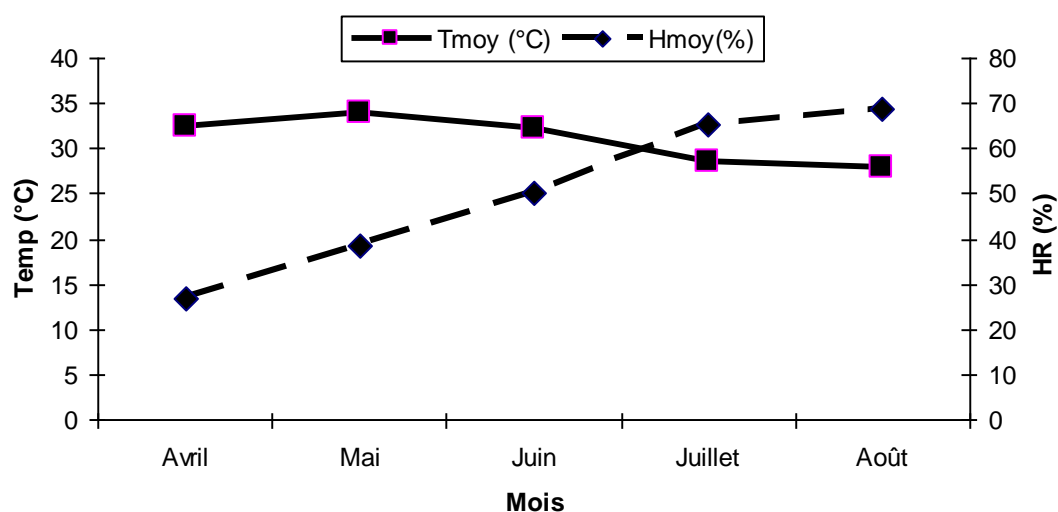


Figure 11. Température et Humidité relative moyennes enregistrées au cours de l'expérimentation

4.1.2 Echantillonnage de sol

Après délimitation des parcelles destinée à l'essai, 5 échantillons élémentaires du sol ont été prélevés au niveau des différentes parcelles élémentaires par la méthode du W à l'aide d'une tarière. Pour chaque parcelle les échantillons ont été mélangés, placés dans des sachets plastiques et transportés au laboratoire. Au total 500 g de sol ont été prélevés par parcelle élémentaire.

4.1.3 Analyse chimique du sol

L'analyse chimique du sol a porté sur les paramètres suivantes : le pH, le Carbone Organique, l'Azote, le Phosphore, l'Ammoniaque et le Nitrate (Tableau 4).

Les échantillons du sol ont été analysés à l'ICRISAT, Sadoré, Niamey, Niger. De cette analyse il est ressorti que les parcelles d'essai au champ a été homogène pour le pH, carbone organique, ammoniaque, nitrate et phosphore, mais les parcelles semées par les graines traitées par l'association des isolats G3G4 ont montré une teneur significativement plus élevées en azote que les autres parcelles (Tableau 4).

Tableau 4. Teneur en éléments minéraux du sol (Faite l'analyse de variance et porter sur le tableau la moyenne parcellaire)

| Traitements | pH | C_Org% | NH4_N mg/kg (sol) | NO3_N mg/kg (sol) | Total_N mg/kg (sol) | Total_P mg/kg (sol) |
|-------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| G3 | 7,080 ^a | 0,1456 ^a | 8,05 ^a | 1,72 ^a | 112,5 ^a | 203,6 ^a |
| G3G4 | 6,843 ^a | 0,1632 ^a | 9,15 ^a | 2,61 ^a | 148,1 ^b | 204,5 ^a |
| G4 | 6,963 ^a | 0,1450 ^a | 6,96 ^a | 1,84 ^a | 126,9 ^{ab} | 222,4 ^a |
| T | 6,847 ^a | 0,1502 ^a | 6,74 ^a | 1,93 ^a | 136,0 ^{ab} | 214,1 ^a |
| Prob.α= 5% | 0,227 | 0,220 | 0,051 | 0,328 | 0,028 | 0,666 |
| CV (%) | 2,0 | 6,9 | 11,4 | 28,7 | 7,9 | 9,8 |

Pour une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre indiquent une différence non significative au seuil $\alpha = 5\%$.

4.1.4 Quantification de l'inoculum initial de *M. phaseolina* de la parcelle expérimentale

La densité initiale de l'inoculum de *M. phaseolina* a été obtenue par isolement du champignon du sol champêtre par la méthode mise au point par Alabouvette (1976).

Individuellement chaque échantillon composite a été séché à la température ambiante pendant une semaine avant d'être broyé dans un mortier et passé à travers un tamis de mailles de 1 mm. Cinq grammes de l'échantillon ont été prélevés et traités dans de l'hypochlorite de sodium.

Le sol a été ensuite placé dans un bêcher de 150 ml contenant 100 ml de NaOCl à 0,525% pendant 10 min. Le NaOCl a été éliminé à l'eau courante en passant la suspension de sol à travers les tamis. Le résidu recueilli sur les tamis de 45 µm a été ajouté à 100 ml d'un milieu de culture PDA encore en surfusion à 55°C. Ce milieu de culture a été rendu sélectif par addition de 1,5 ml d'une solution de NaOCl à 0,525%, 1 ml d'une solution de pentachloronitrobenzène (PCNB) à 2,5g/l et de 5 mg de chloramphénicol (0,05%) par 100 ml de milieu PDA (Ndiaye et al. 2007). Après homogénéisation, ce mélange a été réparti dans 10 boîtes de Pétri et incubé à 30°C pendant 5 à 8 jours. La lecture a consisté à dénombrer les colonies de *M. phaseolina* qui apparaissaient sous forme de petites taches noires de 0,5 – 1 cm de diamètre dans les boîtes.

4.1.5 Dispositif

Le premier jour et le 30^{ème} jour après l'enrobage des semences avec *C. rosea*, les graines ont été semées dans un sol naturellement infesté par *M. phaseolina* dans un dispositif expérimental bloc de Fischer avec quatre traitements et trois répétitions. Les traitements éprouvés ont été: 1. graines enrobées avec l'isolat G3 de *C. rosea* ; 2. graines enrobées avec l'isolat G4 de *C. rosea* ; 3. graines enrobées avec la combinaison des isolats G3 et G4 de *C. rosea* ; et 4. témoin - graines non enrobées.

La parcelle élémentaire a été constituée de 4 lignes de 10 poquets/ligne. Les écartements ont été 0,75 m entre les lignes et 0,50 m sur la ligne. Une graine par poquet a été semée.

4.1.6 Conduite de la culture

Les essais ont été mis en place le 25 Avril et le 24 Mai, donc conduite en condition d'hivernage. Mais avant l'installation de la saison des pluies, les besoins en eau de la culture dans le 1^{er} essai ont été satisfaits à l'aide d'un système d'irrigation goutte à goutte. Le sarclage s'est fait à la demande. Au cours des essais, des traitements insecticides ont été effectués pour contrôler les attaques de pucerons dans le 1^{er} essai et des

attaques thrips dans le 2^{ème} essai.

Les observations sur le terrain ont porté sur :

1. le taux de germination à 7 jours après semis ;
2. le nombre de plants morts et fortement flétris tous les 7 jours ;
3. la quantité de *Rhizobium* sp. par comptage des nodules sur les racines ;
4. la population de *C. rosea* dans la rhizosphère aux périodes ci-après par la méthode de la série des dilutions :
 - a la germination, sur les cotylédons ;
 - au stade ramification (3 nœuds) ;
 - au début de la floraison ;
 - a la maturité physiologique.
5. le poids des graines et fanes à la récolte

4.1.7 Evaluation de la densité de *C. rosea* dans la rhizosphère des plants

La méthode décrite par Bennett & Whipps¹ (2008) a été utilisée. A chaque date d'échantillonnage, 3 plants par traitement ont été délicatement soulevés de la parcelle avec le maximum de racines possibles et de sol y adhérent. Les échantillons ont été ensuite placés dans des sachets et transportés au laboratoire.

Pour l'analyse du sol de la rhizosphère, les plants ont été placés dans des tubes à essai contenant 10 ou 50 ml de H₂O distillée stérile pour laver le sol adhérent aux racines. La suspension de sol a été ensuite analysée par la méthode des séries de dilutions pour estimer la population de *C. rosea* dans le sol de la rhizosphère.

Pour la quantification de la population du bioagent sur les racines, après pesage de la biomasse totale et de la biomasse racinaire, les racines ont été découpées en morceaux de 5 mm et divisées en deux parties. Une partie a été pesée, écrasée au mortier et placée dans un tube à essai

contenant 10 - 50 ml d'eau distillé stérile en fonction des dates d'échantillonnage. La suspension a été analysée par la méthode des séries de dilution pour estimer la densité de l'antagoniste sur les racines.

4.1.8 Estimation de l'inoculum de *Macrophomina phaseolina* dans les tissus

Une partie des racines et des tiges a été séchée à 30°C sur du papier Clinex dans un four à ventilation pendant 10 jours. et ensuite broyée à l'aide d'un broyeur à bille de type Retsch. Le broyage a été effectué à 3000 tours par minute pendant 5 min pour chaque échantillon. Le broyat a été analysé en plaçant 150 mg de tissus de chaque échantillon dans un tube à essai contenant 1,5 ml d'eau de javel à 0,5 % de NaOCl. La suspension a été incubée pendant 30 mn et ensuite est mélangée au milieu de culture semi sélectif à *M. phaseolina* et coulée dans les boîtes de pétri. Après une semaine d'incubation à 30°C les colonies germées dans les boîtes ont été dénombrées.

4.2 Résultats et Discussion

4.2.1 Quantification de l'inoculum initial du sol de *Macrophomina phaseolina*

Pour la densité de l'inoculum initial du sol, l'analyse de variance a ressorti une différence significative au seuil de $\alpha = 5\%$ entre les sols des deux essais (Fig.12). Les parcelles du 2^{ème} essai ont été significativement plus infestées avec une moyenne de 55,8 microsclérotés/g de sol contre 17 microsclérotés/g de sol dans l'essai 1.

Les parcelles témoin de l'essai 2 ont une densité de 102 microsclérotés/g de sol. Il est très probable que cette forte infestation ne reflète pas la réalité au niveau de la parcelle. En effet aucune incidence de cette infestation n'a été observée sur le développement de la maladie et sur la production du niébé. Elle serait donc due à une contamination des échantillons avec des débris végétaux colonisés par le pathogène.

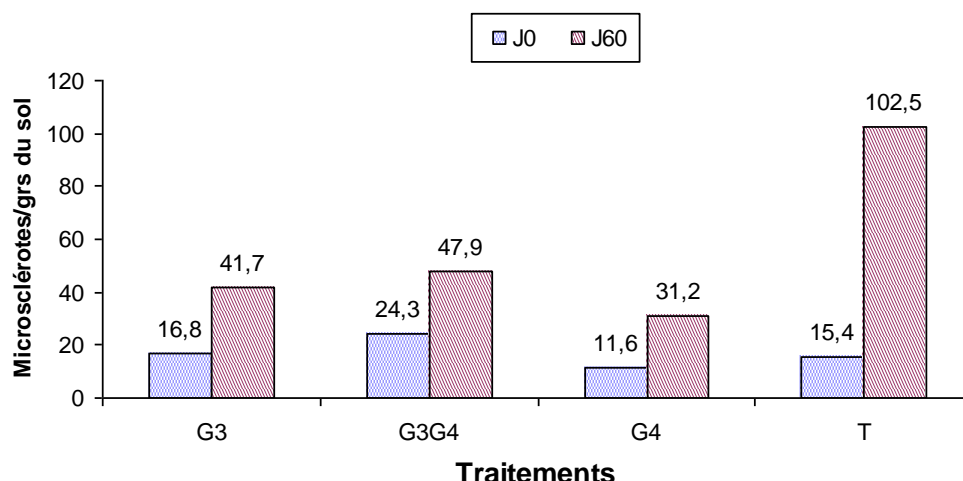


Figure 12. Densité moyenne de l'inoculum initial de *Macrophomina phaseolina* dans les sols des essais 1 et 2

4.2.2 Développement de la pourriture charbonneuse

La sévérité moyenne (4,7) de la maladie évaluée par l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC en anglais) ainsi que le niveau de colonisation des tissus (4515 microscletores par gramme de tissus) du niébé par *M. phaseolina* a été identique au niveau de tous les traitements dans les deux essais (Tableau 5). Par contre les fontes de semis ont été plus importantes dans les parcelles semées avec des graines enrobées avec l'association des isolats G3 et G4 (18,3 %) et faible (4 %) au niveau du témoin (Tableau 6). Mais du point de vue agronomique, l'impact de la fonte de semis sur le rendement était peu important, car les plants survécus disposant de surface nutritive plus importante auraient été en mesure de compenser l'effet des pertes de plantules.

La densité des propagules de *C. rosea* dans la rhizosphère 25 et 45 j après semis, a été plus importante au niveau des parcelles semées avec des graines traitées ($2,3 \times 10^5$) qu'au niveau du témoin ($3,8 \times 10^4$) (Tableau 5). La présence de *C. rosea* dans la rhizosphère des plants du témoin indique que les sols du site d'essais sont infestés par le bioagent, mais à une densité très faible.

Tableau 5. Effet des traitements de semences avec *Clonostachys rosea* sur la fonte de semis, le niveau de colonisation de la rhizosphère et des plants par le bioagent et par *Macrophomina phaseolina* et l'AUDPC 45 jours après semis.

| Traitements | FS % | # propagules de <i>C. rosea</i> (g/ sol et racines) | # propagules de <i>M. phaseolina</i> (g/ tissus racines) | AUDPC |
|----------------------|--------------------|---|--|-------------------|
| G3 | 10,8 ^{ab} | 187918 ^a | 3940 ^a | 5,95 ^a |
| G3G4 | 18,3 ^b | 256655 ^a | 4443 ^a | 4,32 ^a |
| G4 | 7,5 ^a | 245735 ^a | 3943 ^a | 5,6 ^a |
| T | 4,2 ^a | 37942 ^b | 5735 ^a | 2,98 ^a |
| Prob. $\alpha = 5\%$ | 0.022 | <.001 | 0.175 | 0.284 |
| CV (%) | 21.5 | 27.1 | 12.7 | 35.4 |

Pour une colonne, les moyennes suivies d'une même lettre indiquent une différence non significative au seuil $\alpha = 5\%$

6.2.3 Effet des traitements de semences de niébé avec *C. rosea* sur la production de niébé

Pour le poids des plants, le nombre de nodules racinaire de *Rhizobium* sp. 45 j après semis et les rendements en fane, gousse et graines, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements pour les deux durées de conservations. La moyenne pour le poids de plants a été de 543 g, le nombre moyen de nodules racinaire de *Rhizobium* sp, de 21, le rendement en gaines, de 955 kg/ha et le rendement en fane, de 2807 kg/ha. Par contre, l'analyse individuelle de, l'essai semé avec les graines non conservées a montré une différence entre les traitements. Les rendements en fanes et en graines ont été plus élevés dans les parcelles semées avec les graines enrobées avec l'association des isolats G3 et G4. Les rendements en graines obtenu dans cette étude peuvent être considérés acceptables, car le rendement moyen mondiale du niébé est de 300 kg/ha et le rendement moyen africaine varie entre 50 à 550 kg/ha (Cisse et al., 1995)

CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE

Le développement *in vitro* de *M. phaseolina* en présence des isolats de *C. rosea* a été inhibé avec des taux de 40 à 70 % en fonction de l'isolat. Les isolats G3 avec un taux d'inhibition de 70 % et G4, avec un taux d'inhibition de 55,5 %, mais en plus avec un niveau potentiel de mycoparasitisme très élevé ont été retenus pour les essais en serre et au champ. Il faut noter cependant, que le potentiel de contrôle exprimé *in vitro* par les isolats du bioagent ne sont pas toujours confirmé en conditions semi contrôlées ou réelles.

Le taux de levée des plants a été de 100 % pour les traitements avec les bioagents. Par contre les graines non enrobées, semées dans le sol infesté avec *M. phaseolina* ont levé à 87 %. Ces résultats indiquent que les isolats du bioagents utilisés dans nos expériences n'affectent pas négativement ni la germination ni la levée des plants.

L'apparition très précoce de plants morts au niveau de l'essai en serre semé avec des graines conservées pendant 30 j serait dû aux températures élevées (des maxima de 50,6°C) et à la faible humidité relative (des minima de 24,1 %) qui ont prévalu au cours de l'essai. En effet, selon Sutton et al. (1997), les températures supérieures à 30°C sont défavorables à l'action de contrôle de *C. rosea* dont les températures optimales d'action se situent entre 20 et 25°C. Par ailleurs le niveau d'infestation du sol d'expérimentation avec 423 microsclérotes par gramme de sol était très élevé. En effet, selon Ndiaye et al. (2008) un taux d'infestation de 53 microsclérotes par grammes de sol a provoqué au champ 100 % de mortalité des plants de niébé. Malgré ces conditions drastiques pour la culture, nos isolats ont permis d'obtenir un taux de survie de 55 % des plants par rapport au 25 % du témoin non traité. Par conséquent, les isolats G3 et G4 de *C. rosea* utilisés dans nos essais peuvent potentiellement protéger efficacement le niébé contre la pourriture charbonneuse.

L'analyse de la rhizosphère a révélé la présence de tous les bioagents appliqués sur la graine, bien que des différences dans les échantillons ont été observées (Tableau 5). Ces résultats sont en concordance avec ceux de Bennett & Wipps² (2008) qui ont montré que *C. rosea* survit bien dans la rhizosphère de l'oignon et de la carotte. La population du bioagent a augmenté sensiblement durant la période de huit semaines de l'expérimentation.

Le nombre de spores viables observées à J30 ($2,5 \cdot 10^5$) peut être considéré comme suffisant pour assurer une protection efficace des graines du niébé. En effet, Bennett & Wipps² (2008) ont indiqué dans des expérimentations réalisées en serre avec *C. rosea* et trois autres bioagents, qu'à la concentration initiale de $1 \cdot 10^5$ spores par ml de suspension, le bioagent était efficace pour protéger les plantules de carotte et d'oignon contre la fonte des semis.

Au champ, l'effet de la conservation sur le contrôle de *M. phaseolina* a été moins évident car la plus part des paramètres analysés n'a pas ressorti une différence significative entre les traitements et le témoin. Cependant, au niveau de l'essai 1 implanté avec des graines traités, mais non conservées, l'association des isolats G3 et G4 a donné le meilleur rendement en fanes et en graine et le plus grands nombre de nodules par plants. James et William (2007) ont également indiqué que l'isolat *C. rosea* 88-710 pouvait agir en symbiose avec les bactéries rhizobium pour stimuler et produire un effet additionnel sur le développement de nodules fixateurs d'azote des légumineuses et sur l'augmentation de la croissance des fèves, du soja, des pois et du trèfle.

Ces résultats ne confirment pas ceux obtenus en serre, où le traitement G3G4 était moins performant que les isolats pris séparément dû probablement aux bonnes conditions pluviométriques dans lesquels l'essai a évolué.

CONCLUSION GENERALE ET SUGGESTION

Les résultats obtenus en condition in vitro montrent un bon niveau de contrôle de *M. phaseolina* par les bioagents expérimentés. Ces résultats ont aussi été confirmés en condition de serre. Par conséquent, la conservation à 40°C pendant 30 jours de semences traitées avec *C. rosea* n'affecte ni la viabilité des spores, ni le pouvoir antagoniques du bioagent.

Au champ, l'effet de la conservation sur le contrôle de *M. phaseolina* a été moins évident à 30 jour de conservation. L'association des isolats G3 et G4 a donné le meilleur rendement en fanes et en graine et le plus grands nombre de nodules par plants.

Nous suggérons la continuation des recherches sur le thème pour la confirmation de ces résultats. A la lumière de nos résultats on peut envisager la conservation des graines traitées avec *C. rosea* jusqu'à 30 jours à la température de 40°C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam T., 1995. Etude de deux parasites d'origine tellurique sur niébé : *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid et *Striga gesnerioides* (Willd). Thèse de docteur des sciences naturelles. Université Abdou Moumouni de Niamey faculté des sciences. 102p
- Adam T., 1986. Contribution à la connaissance des maladies de niébé (*Vigna unguiculata*) (L.) WALP.) au Niger avec mention spéciale au *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Thèse de doctorat ingénieur. Université de Rennes I-ENSAR, 131p
- Alabouvette, C., 1976. Recherche sur l'écologie des champignons parasites dans le sol. VIII. Etude écologique de *Macrophomina phaseolina* dans le sol grâce à une technique d'analyse selective. Phytopathology. 8: 147-157
- Alabouvette, C., Lemanceau P., Steinberg C., 1993. La lutte microbiologique contre les maladies d'origine tellurique. Phytoma - La défense des végétaux 452 : 36 – 40
- Bennett, A. J. and Whipps¹, J. M., 2008. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. Applied Soil Ecology 38: 83 – 89
- Bennett, A. J. and Whipps², J. M., 2008. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. Biological control 44: 349 - 361
- Cisse, N., Thiaw, S., Ndiaye, M., and Hall, A. E. 1995. Registration of 'Mouride' Cowpea. Crop Science 35: 1215-1216.
- Cisse, N. and Hall, A. E., 2002. La culture traditionnelle du niébé au Sénégal. ISRA, CNRA. Bambey Sénégal. 37p

- Cook, G. E., Boosalis, M. G., Dunkle L. D., and Odvody, G. N., 1973. Survival of *Macrophomina phaseoli* in corn and sorghum stalk residue. Plant Disease. 57: 873-875 p
- Cottingham, C., 1981. Numbers and distribution of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil of South Carolina. USA, 355-356
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: Effect of soil moisture, carbon: nitrogen ratio, carbon sources, and nitrogen concentrations. Phytopathology 65: 236 - 240
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1977. An annotated bibliography of *M. phaseoli*, 1905-1975. Universidade Federal Viçosa, Brazil. 277 p.
- Diourte, M., Starr, J. L., Jeger, M. J., Stack, J. P. and Rosenow, D. T. 2007. Charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) resistance and the effects of stress on disease development in sorghum. Plant Pathology 44: 196-202.
- Eparvier A. 2003. Compétition entre *Fusarium* pathogènes et *Fusarium* non pathogènes pour la colonisation des tissus racinaires: mise au point et utilisation de techniques sérologique et génétique de marquage. Thèse doctorat. Lyon, France.
- FAO, 2004. Faostat Agricultural Data. www.fao.org
- IITA, 1983. Le niébé. Manuel de formation. CILSS INSAH / Pays-Bas Niamey – Niger, 155p
- Israel S., Mawar R., Lodha S., 2005. Soil solarization, amendments and biocontrol agents for the control of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* in aridisols. Biology 146: 481-489.

- Jana, T. K., Singh, N. K., Koundal, K. R., Sharma, T. R. 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR. Microbiology. 51: 159-164
- James S. et William G. B., 2007. Production et utilisation d'endophytes sous forme de nouveaux produits inoculant pour améliorer la vigueur, la santé, la croissance, le rendement des plantes en réduisant les contraintes environnementale et pour diminuer la dépendances vis-à-vis des pesticides chimiques utilisés dans la lutte. <http://www.patfr.com/classification/A/01401>.
- Mihail, D. J., 1989. *Macrophomina phaseolina*: Spatio-temporal dynamics of inoculums and of disease in a high susceptible crop. Phytopathology 79: 848 - 855
- Ndiaye, M., Termorshuizen, A. J. and van Bruggen A. H. C. 2008. Effect of rotation of cowpea (*Vigna unguiculata*) with *Digitaria exilis* and *Pennisetum glaucum* on *Macrophomina phaseolina* densities and cowpea yield. African Journal of Agricultural Research. 3: 37 - 43
- Ndiaye, M., Termorshuizen, A. J. and van Bruggen A. H. C. 2007. Combined effects of solarization and organic amendment on charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* in the Sahel. Phytoparasitica 35:392-400
- Ndiaye, M., 2007. Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. Thèse PhD à l'université de Wageningen – Pays Bas,
- Ndiaye, M., 2005. Variabilité physiologique et pathogénique des isolats de *Macrophomina phaseolina* originaire de trois systèmes de culture du Sahel. Centre Régional AGRHYMET. Niamey (Niger) : 88-97. Dans : Rapport Scientifique du Centre Régional AGRHYMET (CRA).
- Karine P., 2002. Lutte biologique par *Pythium oligandrum* en cultures hors-sol : dynamique des populations, antagonisme et rôle d'une

protéine dans l'induction de résistance chez la tomate. Thèse de Doctorat. Université de Brest, Brest, France.

Rao, N. K., Hanson, J., Dulloo, M., E., Ghosh, K., Nowell, D. et Larinde, M., 2006. Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes. Bioversity International. ILRI/FAO/CTA. Rome. 181p.

Ravnskov, S., Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Bødker, L., Jensen, D. F., Karlinski, L., and Larsen J., 2006. Soil inoculation with the biocontrol agent *Clonostachys rosea* and the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* results in mutual inhibition, plant growth promotion and alteration of soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry 38: 3453 - 3462

Schroers, H-J., Samuels, G. J., Seifert, A. K., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. Rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. Mycologia. 91: 365 - 385.

Short, G. E., Wyllie, T. D., and Bristow, P. R., 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and residue of soybean. Phytopathology 70: 13 - 17

Short, G. E., Wyllie, T. D., and Ammon, V. D., 1978. Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. Phytopathol. 68 : 736 - 741

Smith, W. H., 1969. Germination of *Macrophomina phaseoli* sclerotia as affected by *Pinus lambertiana* root exudates. Can. J. Microbiology 15: 1387 - 368

Sutton J. C., 1994. Biological control of strawberry diseases. Advances in Strawberry Research. 13: 1-12

Sutton J. C., Li de W., Peng G., Yu H. and Zhang, P. 1997. *Gliocladium roseum* – a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. Plant disease. 81: 316-328.

Wakelin, S. A.; Gupta, V. V.S.R.; Harvey, P. R.; Ryder, M. H. 2007. The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. Canadian Journal of Microbiology 53: 106-115

XUE A. G., 2002. Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* Strain ACM941. Phytopathology 93: 329-335

XUE A. G., 2003. Efficacy of *Clonostachys rosea* strain ACM941 and fungicide seed treatments for controlling the root rot complex of field pea. Agricultural Institute of Canada. Ottawa 83: 519-524

<http://www.pmra-arla.gc.ca/francais/pdf/reg/reg2002-01-f.pdf> Fongicide biologique RootShield *Trichoderma harzianum* Rifai souche KRL-AG2

http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Macrophomina/macrophominia_p_haseolinia.HTM

http://www.itvfrance.com/vigne_terroir/maladies_bois.php.2005.

Maladies du bois - Moyens de lutte contre les maladies du bois Institut Français de la Vigne et du Vin